Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med., Dr. rer.nat. Ernst S c h ü t t e

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE OXYDATION VON OESTRADIOL-17α-T ZU OESTRON NACH LEBERSCHÄDIGUNG.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kraas, Ernst
Halle/Saale

1970

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität
Berlin

Direktor: Professor Dr. med., Dr. rer.nat. Ernst S c h ü t t e

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE OXYDATION VON OESTRADIOL-17α-T ZU OESTRON NACH LEBERSCHÄDIGUNG.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kraas, Ernst
Halle/Saale

Dekan: Prof. Dr. med. Herbert L a x

Referent: Prof. Dr. rer.nat., Dipl.-Chem. Martin W e n z e l

Korreferent: Prof. Dr. med., Dr. rer.nat. Heinz T i e d e m a n n

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26. Mai 1970

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	3
1.1.	Funktion der Leber im Oestradiolstoffwechsel	4
1.2.	Prinzip der stoffwechsellabilen Tritiummarkierung des Oestradiols	6
2.	Methodik	8
2.1.	Versuchstiere	8
2.2.	Vorbehandlung der Tiere	8
2.3.	Injektionslösung	9
2.4.	Radioaktivitätsbestimmung	10
2.5.	Sammeln des Urins	10
2.6.	Destillation des Urins	11
2.7.	Gewinnung des Atemwassers	11
2.7.1.	Beschreibung der Apparatur	11
2.7.2.	Verhalten der Tiere im Käfig	13
2.7.3.	Durchströmungsverhältnisse des Käfigs	14
2.7.4.	Mischeffekt des HTO mit körperfremdem H_2O	16
3.	Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen zur in vivo Oxydation von Oestradiol 17α-T	19
3.1.	Bestimmung der HTO-Konzentration im Urin von gesunden Ratten	20
3.2.	Bestimmung der HTO-Konzentration im Atemwasser von gesunden Ratten	21
3.2.1.	Ist die 17ß-Steroid-Dehydrogenase der limitierende Faktor für die Oxydation von Oestradiol zu Oestron?	24
3.3.	Bestimmung der HTO-Konzentration im Atemwasser von Tieren nach Leberschädigung	27
3.3.1.	Mit CCl_4	28
3.3.2.	Mit Äthionin	31
3.3.3.	Mit Thioacetamid	32
3.4.	Histologie der untersuchten Rattenlebern	33
3.5.	Tabellarische Übersicht über die durchgeführten Tierversuche	37
4.	Diskussion	38
4.1.	Methodische Kritik von Untersuchungen mit einer stoffwechsellabilen Tritiummarkierung	38
4.2.	Wie kann die veränderte Oestradioloxydation nach Leberschädigung erklärt werden?	41
5.	Zusammenfassung	47
6.	Literatur	49

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546513_0084

1. Einleitung und Problemstellung

Nach der Mitteilung von Zondek 1934 (1), daß Leberbrei Oestradiol zu inaktivieren vermag, haben zahlreiche Nachuntersucher (5, 6, 7, 8, 9, 1o, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19) dieses Phänomen der"Inaktivierung" in vivo und in vitro mit tierischen und menschlichen Geweben geprüft. Danach wird Oestradiol im nichtgraviden Organismus vorwiegend in der Leber durch Oxydation und Veresterung inaktiviert. Die Oxydationsprodukte werden entweder frei oder mit Schwefelsäure bzw. Glucoronsäure konjugiert über die Galle oder im Harn ausgeschieden. Bei den nichtkonjugierten Ausscheidungsprodukten handelt es sich vorwiegend um Oestradiol, Oestron und Oestriol (2), deren biologische Aktivität sich im Allen-Doisy-Test annähernd wie 100 : 10 : 1 verhält (4).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe von "Stoffwechsel-labil" mit Tritium markiertem Oestradiol-17α-T im Tierexperiment die in vivo Oxydation von Oestradiol zu Oestron zu messen.

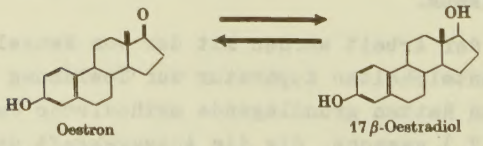
Das Prinzip der Methode besteht darin, dem Versuchstier Oestradiol-17α-T zu injizieren. Dieses überträgt bei der Oxydation zu Oestron sein Tritium auf DPN unter Bildung von DPN-T, welches seinerseits in der Atmungskette zu Tritiumwasser (HTO) verbrannt wird. Die damit im Körperwasser auftretende Tritiumaktivität, die dann auch im Wasser der Aus-Atem-Luft erscheint, ermöglicht unter bestimmten Voraussetzungen (s. Diskussion Kap. 4.1.) Rückschlüsse auf die Mindest-Oxydation des Oestradiols im Gesamtorganismus.

Im ersten Teil der Arbeit werden mit der von Wenzel und Kleucker (36) entwickelten Apparatur zur Gewinnung des Ausatmungswassers von Ratten grundlegende methodische Untersuchungen (s. Meth.Kap.2.7.) gemacht, die die Aussagekraft der mit dem Gerät gefundenen Meßergebnisse abgrenzen. Weiter wird die Frage beantwortet, ob bei gesunden Ratten die Kapazität der 17β-Steroid-Dehydrogenase den in vivo Umsatz von Oestradiol zu Oestron begrenzt. Abschließend wird gezeigt, daß nach akuter und chronischer Leberschädigung bei Ratten die Oestradioloxydation verändert ist.

1.1. Funktion der Leber im Oestradiolstoffwechsel
(zusammenfassende Darstellung siehe (4))

1. Abbau des Oestradiols durch Oxydation zum Oestron und weiter zu Oestriol.
2. Veränderung des Steroidmoleküls durch Hydroxylierungsprozesse und vielleicht Aufspaltung des aromatischen Rings A und des Rings D.
3. Bildung von Oestro-Proteinen (siehe 4 S. 125).
4. Konjugierung des Oestradiols und seiner Derivate mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure.
5. Ausscheidung vorwiegend konjugierter Oestradiolderivate (meist Oestriol) mit der Galle. Teilnahme am enterohepatischen Kreislauf.

Die unter 1. aufgeführte Oxydation von Oestradiol zu Oestron läuft unabhängig von anderen Veränderungen am Steroidmolekül ab, welche unter 2 - 5 aufgeführt wurden. Sowohl bei Inkubation von Gewebsschnitten bzw. -homogenaten mit Oestradiol (5) als auch bei Injektion von Oestradiol in den lebenden Organismus (6) wird das Oestradiol schnell zu Oestron oxydiert. Bei dieser Reaktion stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der reduzierten und der oxydierten Form des Hormons ein. (Siehe Formelschema 1)



Oestron — 17 β-Oestradiol

Formelschema 1

Für die Oxydation sind neben dem Enzymprotein 17 ß-Steroiddehydrogenase als Coenzyme DPN (7) bzw. TPN als Wasserstoffüberträger (8) notwendig.

Die 17 ß-Steroid-Dehydrogenase konnte außer im Leberparenchym auch im Mamma-, Placenta- und Ileumgewebe (9, 10, 11) und in Erythrocyten (12) nachgewiesen werden. Sie konnte jedoch bisher nur aus Säugetierleber (10) bzw. Pseudomonas testosteroni (13) isoliert werden. Aus allen Untersuchungen geht jedoch hervor, daß im nicht graviden Organismus der Leber die Hauptfunktion bei der Inaktivierung des Oestradiols zukommt.

Im Herz-Lungen-Präparat fanden Israel et al. (14) und Schiller (15) keine Inaktivierung. Blieb aber die Leber mit in den Kreislauf eingeschaltet, so beobachteten Zondek und Sklow (16) eine vollständige Inaktivierung des Oestradiols und seiner Derivate selbst nach selektiver Zerstörung des Reticulo-endothelialen Systems der Leber.

Das für die Reaktion benötigte Coenzym DPN bzw. TPN findet sich in bestimmter Compartmentierung im Cytoplasma. Villee et al. (17) fanden in der Placenta ein spezifisches 17 ß-Steroid-Dehydrogenasesystem welches als Wasserstoffakzeptor DPN benutzt und ein zweites Steroid D-H-system welches als Wasserstoffakzeptor TPN benutzt. Außerdem konnten sie ein Transhydrogenasesystem nachweisen. Während sie beide Systeme getrennt aktivieren, hemmen und elektrophoretisch bzw. chromatographisch trennen konnten, postulieren Talalay und Williams-Ashman (18) ein einheitliches System, das sowohl durch DPN als auch durch TPN aktiviert werden und durch abwechselnde Oxydation und Reduktion des Oestradiols als Transhydrogenasesystem Wasserstoff zwischen den Pyridinnucleotiden übertragen soll (siehe folgendes Schema).

$$\text{Oestradiol-17 ß} + \text{DPN}^+ \longrightarrow \text{Oestron} + \text{DPNH} + \text{H}^+$$
$$\text{Oestron} + \text{TPNH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{Oestradiol-17 ß} + \text{TPN}^+$$

$$\text{TPNH} + \text{DPN} \longrightarrow \text{TPN} + \text{DPNH}$$

Dieses Transhydrogenasesystem beobachteten auch Jarabak et al (19) in der Placenta.

Ob sich diese in der Placenta gefundenen Enzymsysteme auch in der Leber nachweisen lassen und ob sie in der Leber physiologischerweise eine entscheidende Rolle spielen, bleibt bisher abzuwarten. (20)

1.2. Prinzip einer stoffwechsellabilen Tritiummarkierung des Oestradiols.

Versuche an Ratten (27,28) hatten gezeigt, daß mit Hilfe eines 17-Hydroxysteroides, das am C_{17}-Atom mit Tritium markiert ist, die Oxydation von 17-Hydroxy- zu 17-Ketosteroiden innerhalb des Organismus erfaßt werden kann. Durch die Oxydation von Hydroxy- zur Ketogruppe am C_{17}-Atom wird das Tritium vom Molekül abgespalten. Dies geschieht mit Hilfe der 17-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase, die DPN oder TPN als Coenzym benötigt. Bei dieser Oxydo-Reduktion lagern die Coenzyme das Tritium unter Reduktion zu DPN-T bzw. TPN-T an und schleusen ihrerseits das Wasserstoffisotop in die Atmungskette ein, in der das Tritium zu Wasser verbrannt wird. (Siehe Formelschema 2 Seite 7)

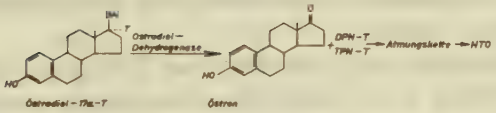
Das aus DPN-T oder TPN-T gebildete Tritiumwasser (HTO) vermischt sich nach kurzer Zeit mit dem Gesamtkörperwasser.

Das Auftreten von einem Molekül Tritiumwasser (HTO) zeigt damit die Oxydation von einem Molekül Oestradiol an (27).

So läßt sich mit diesem Prinzip beim Oestradiol die Mindestoxydation dieses Hormons messen, unabhängig vom Ort der Oxydation im Körper und ohne eine Vielzahl von Metaboliten isolieren zu müssen.

Zur Bestimmung der Menge an Tritium im Gesamtkörperwasser mißt man von einem Aliquot aus Urin oder Atemwasser die

spezifische Aktivität und rechnet auf den Gesamtgehalt an Körperwasser um. Das Gesamtkörperwasser errechnet sich nach Günther (29) bei Nagern als 68 % des Körpergewichtes. Diese Möglichkeit der Tritiumbestimmung im Gesamtkörperwasser ist der entscheidende Vorteil des geschilderten Prinzips.



Formelschema 2

Bei allen anderen bekannten Methoden zur Umsatzbestimmung ist der Gehalt an einem bestimmten Metaboliten in einzelnen Körperbestandteilen nicht als repräsentativ für den Gehalt im gesamten Organismus anzusehen. Diese Voraussetzung trifft allein für die Verteilung radioaktiven Wassers im Gesamtkörperwasser zu.

2. Methodik.

2.1. Versuchstiere.

Für die Versuche verwendete ich geschlechtsreife männliche Tiere eines hauseigenen Wistar-Rattenstammes. Die Tiere waren im Alter von 4 bis 6 Monaten mit einem Körpergewicht zwischen 140 und 210 g.

2.2. . Vorbehandlung der Tiere.

Die Tiere wurden zur Leberschädigung mit verschiedenen Giftstoffen vorbehandelt. Ich versuchte mit CCl_4 und Äthionin eine akute Lebervergiftung zu erreichen, mit TAA eine chronische Leberschädigung nachzuahmen:

a. Mit CCl_4 (rein)

Einer Gruppe von 8 Ratten wird über vier Tage verteilt CCl_4 s.c. (unter die Rückenhaut) injiziert.

Zwei Ratten erhalten insgesamt 3,6 ml CCl_4/kg
" " " " 4,3 ml "
" " " " 19,2 ml "
" " " " 29,4 ml "

Die so vorbehandelten Tiere werden am 5. Tag untersucht.(jeweils als Paar).

b. Mit Äthionin (p.A.)

Einer Gruppe von 4 Tieren wird über 4 Tage verteilt Äthionin i.p. injiziert:

Zwei Ratten erhalten insgesamt 1500mg Äthionin/kg
" " " " 2100 mg " "

Die so vorbehandelten Tiere werden am 5. Tag untersucht.(jeweils als Paar).

c. Mit TAA (p.A.)

Einer Gruppe von 12 Tieren wird über 100 Tage verteilt insgesamt 3 g TAA/Ratte dem Futter ("Schietzer-Kost") beigemischt.

Von den 12 Tieren sterben 9 vor dem 100. Tag der Vorbehandlung. Die noch lebenden 3 Tiere werden am 102. Tag untersucht.

2.3. Injektionslösung.

Die Tritium-markierten Oestradiol-Präparate wurden freundlicherweise von der Schering A.G. Berlin (Dr. P.E. Schulze) zur Verfügung gestellt.

17β-Oestradiol-17α-T hatte eine spezifische Aktivität von 642 µCi/mg. Die Reinheit des Präparates wurde durch Dünnschichtchromatographie auf einer analytischen Platte mit Kieselgel H überprüft. Als Laufmittel diente Essigester - Cyclohexan 40 : 60, zum Vergleich wurde nicht-markiertes Oestradiol aufgetragen.

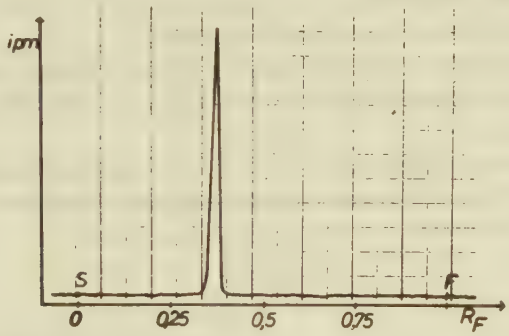


Abbildung 1

Radiochromatogramm zum Nachweis der Reinheit des Oestradiol-17α - T.

Die Radioaktivitätsmessung erfolgte im "Dünnschicht-Scanner" der Firma Berthold und ergab ein Maximum mit R_F = 0,36 (s. Abb. 1). Beim Anfärben mit Schwefelsäure-Methanol entstand ein rotgelber Fleck, der mit dem der Vergleichssubstanz übereinstimmte. Damit war die Reinheit des Präparates nachgewiesen.

Das Oestradiol-17α-T wurde zur Injektion in Propylenglycol (rein) gelöst. 0,5 mg Oestradiol/ml Propylenglycol. Bei allen Versuchen wurde das Gemisch i.m. ins Hinterbein der Ratten injiziert.

2.4. Radioaktivitätsbestimmung.

Die Radioaktivität der Proben (Urindestillat oder Atemwasser) wurde im Flüssig-Scintillationszähler "Tri-Carb" der Firma Packard gemessen.

Die Scintillationsflüssigkeit wurde hergestellt aus:

120 g Naphthalin
4,00 g PPO (2,5-Diphenyloxazol)
0,05 g Dimethyl-POPOP (1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyl-oxazolyl)-Benzol)

mit Dioxan zu 1 Liter lösen.

Zur Messung wurden eingesetzt:

0,2 ml Harndestillat, Atemwasser bzw. Pufferlösung
6,5 ml Scintillationsflüssigkeit

Der Nullwert wurde mit destilliertem Wasser und Scintillationsflüssigkeit bestimmt und jeweils von den Meßwerten abgezogen.

Die Zählausbeute wurde nach Zugabe eines internen Standards (HTO in Dioxan) und Messen der Differenz der Impulse bestimmt.

$$ZAB\ (\%) = \frac{ipm}{zpm} \times 100$$

Die Zählausbeute (ZAB) betrug, je nach Reinheit des verwendeten Dioxans, etwa 14 - 16 %.

2.5. Sammeln des Urins.

Der Urin wurde in Stoffwechselkäfigen (s. Abb. 2) unter Zusatz von Toluol zur Verhinderung mikrobieller Besiedlung gesammelt. Zur Bestimmung der Gesamtausscheidung von Tritium wurde der Urin mit Äthanol auf ein konstantes Volumen aufgefüllt, um eine homogene Phase zwischen Urin und Toluol herzustellen und eventuell im Tuluol angereichertes Steroid mit zu erfassen. Durch Zentrifugieren wurde das Urinsediment und verunreinigende Futterkrümel abgetrennt.

Abbildung 2
Stoffwechselkäfig
zum Sammeln des Urins

2.6. Destillation des Urins.

Für die Bestimmung des HTO-Gehaltes im Urin wurde dieser destilliert. 0,3 ml Urin wurden mit 0,1 ml n/100 NaOH alkalisiert zur Bindung flüchtiger Carbonsäuren und zur Destillation eingesetzt. Diese erfolgte als Gefriertrocknung, wie bei Diringer (57) beschrieben.

2.7. Gewinnung des Atemwassers.

2.7.1. Beschreibung der Apparatur (36).

Moore (37) zeigte - nach Injektion von HTO i.V. an einer Versuchsperson - beim Vergleich der HTO-Konzentration in Plasma-, Urin- und Ausatmungswasser, daß sich die im Plasma- und Atemwasser gemessenen Werte höchstens um 6 % voneinander unterscheiden. Er erklärt diese Unterschiede durch einen Isotopieeffekt. Seine

Arbeit zeigt jedoch, daß die spezifische Aktivität im Ausatmungswasser besonders bei vergleichenden Untersuchungen ein getreuer Spiegel des Körperwassers ist. Von dieser Erkenntnis machten Wenzel und Kleucker Gebrauch und entwickelten eine einfache Anordnung zum Auffangen von Atemwasser, dessen Prinzip die Abbildung 3 veranschaulicht.

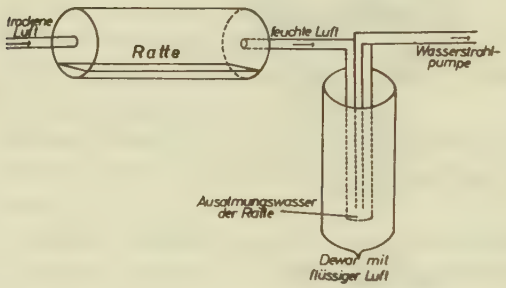


Abbildung 3
Schema der Apparatur zur Gewinnung des Atmungswassers von Ratten.

Das Versuchstier (Ratte) wird nach Injektion des radioaktiven Oestradiols in einen röhrenförmigen Käfig gesetzt, durch den getrocknete Luft geleitet wird.

Zum Trocknen wurde die Luft durch Schwefelsäure geleitet, passierte dann einen Trockenturm mit Kaliumhydroxyd, das außer Wasser vor allem auch mitgerissene Schwefelsäure abfangen sollte und einen weiteren Trockenturm mit $CaCl_2$; schließlich wurde die Luft durch zwei Kühlfallen geleitet, die in flüssigen Stickstoff tauchten. Dort wurden Reste von Feuchtigkeit aus der Luft entfernt; außerdem boten sie eine Kontrolle für die Trockenheit der Luft. Die vielen Hintereinandergeschalteten Trockenanlagen waren nötig wegen des relativ starken Luftstromes (für

ein Tier 60 l, für 2 Tiere 100 l). Es wurde immer darauf geachtet, daß sich in der zweiten Kühlfalle kein Wasser mehr sammelte. Vor der Passage des Rattenkäfigs wurde die Luft aufgeheizt.

Durch seine Atmung belädt das Tier die Luft im Käfig mit Wasserdampf. Die den ausgeatmeten Wasserdampf enthaltende Luft strömt dann - angesaugt durch eine Wasserstrahlpumpe - durch eine Kühlfalle, in welcher der Wasseranteil kondensiert wird. Das Kondensat ist praktisch destilliertes Wasser und kann ohne weitere Aufarbeitung als Aliquot des Gesamtkörperwassers im Flüssig-Scintillations-Zähler gemessen werden. Durch Wechsel der Kondensationsvorlagen lassen sich alle 15 bis 30 Minuten Proben des Atemwassers gewinnen. Ein weiterer Vorteil der Apparatur liegt darin, daß man mehrere Tiere gleichzeitig in den Käfig setzen kann und dadurch leichter Mittelwerte erhält.

2.7.2. Verhalten der Tiere im Käfig.

Die Tiere mußten bei unserer Versuchsanordnung während der ganzen Untersuchungszeit (8 bis 10 Stunden) im Käfig bleiben. Während dieser Zeit schwankt die Wasserausbeute (im Mittel fangen wir pro Stunde zwischen 0,36 - 0,41 ml pro 100 g Ratte in der angeschlossenen Kühlfalle auf) durch das Urinieren der Tiere im Käfig.

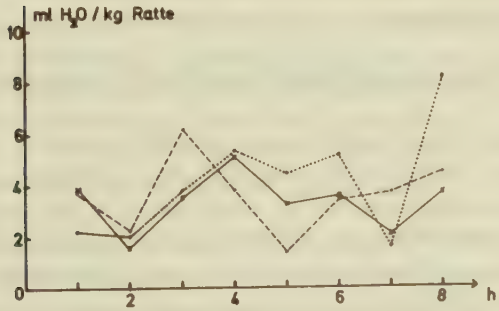


Abbildung 4

Aufgefangene Kondensatmenge in ml/kg Ratte.
Untersucht wurden 3 Tiere, Beobachtung jeweils über 8 h.

Es läßt sich beobachten, daß die Tiere etwa alle 3 bis 4 Stunden Urin lassen, was sich in der Kurve der aufgefangenen Wassermenge als Maximum zeigt (s. Abb. 18). Dieses Urin-Körperwasser verfälscht leicht die gemessenen Werte des Atemwassers, weil das zum Zeitpunkt des Urinierens aufgefangene Urinwasser einem Körperwasser entspricht, das die Niere schon viel früher kontinuierlich in die Harnblase ausschied.

Da die Tiere während der Untersuchungszeit im Käfig ständig völlig ausgetrocknete Luft einatmen und außerdem keine Flüssigkeit bzw. Nahrung aufnehmen, verlieren sie regelmäßig ungefähr0,75 % ihres Körpergewichts/Stunde im Käfig (s. Tabelle 1).

Tabelle 1

Gewichtsverlust von 6 Tieren nach 10 Stunden Aufenthalt im Käfig.

Tier Nr.	1	2	3	4	5 + 6	Mittelwert
Anfangsgewicht in Gramm	187	176	245	340	380	-
Gew.Verlust in Gramm	15	13	17	30	25	-
Gew.Verlust in % in 10 h	8,2	7,4	7,0	8,9	6,5	7,6

Der Gewichtsverlust ist vorwiegend auf den Wasserverlust bei der Atmung und beim Urinieren zurückzuführen. Eine geringe Rolle spielt auch der Gewichtsverlust durch Kot und CO_2-Abatmung.

2.7.3. Untersuchung der Durchströmungsverhältnisse des Tierkäfigs.

Bei dieser Untersuchung soll geprüft werden, inwieweit einerseits das im Käfig befindliche Luftvolumen (bzw. sein Feuchtigkeitsgehalt), andererseits der sich an der Innenwand des Käfigs ausbildende Flüssigkeitsfilm die Ergebnisse der Radioaktivitätsmessung fälschend beeinflussen. Außerdem soll festgestellt werden, wie schnell die Änderung des Radioaktivitätsgehaltes der Durchströ-

mungsluft erfaßt werden kann.

Um dies zu überprüfen, setze ich zunächst anstelle eines Tieres zwei Stunden lang zwei flache Schälchen mit je 20 ml inaktivem Wasser gefüllt in den Käfig und lasse getrocknete Luft durchströmen. Nach zwei Stunden wechsle ich die beiden Schälchen gegen zwei gleiche mit je 20 ml radioaktivem Wasser (21 x 10^3 ZPM/ml entspricht etwa 1/10 uCi/ml bei 10 % Zählausbeute) aus.

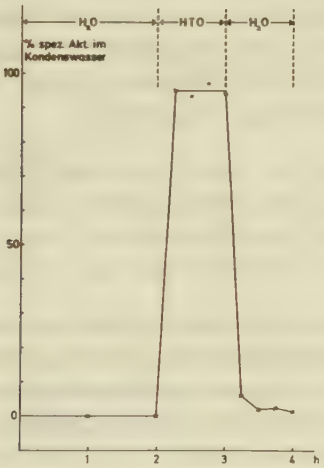


Abbildung 5

Überprüfung der Versuchsanordnung gemäß Abb. 3, S. 12 auf "Verschmieren" des Aktivitätsprofils bei Änderung der spezifischen Aktivität der Wasserproben.

0.-2.h H_2O-Probe im Tierkäfig; spez.Akt. 0 zpm/ml
2.-3.h HTO-Probe im Tierkäfig; spez.Akt. $21 \cdot 10^3$ zpm/ml=100%
3.-4.h H_2O-Probe im Tierkäfig; spez.Akt. 0 zpm/ml

Wie Abbildung 5 zeigt, steigt schon bei der 1. Messung (nach 15 Minuten) die Aktivität im aufgefangenen Wasser auf 94,8 % der eingesetzten Aktivität/ml an und erreicht nach 45 Minuten ein Maximum von 97,1 %. Nach 60 Minuten wechsle ich erneut die Schälchen gegen die Schälchen mit

inaktivem Wasser aus und wie aus der Kurve ersichtlich, fällt die Aktivität bereits nach 15 Minuten auf 6,3 % ab. Sie verminderte sich nach 60 Minuten bis auf 1,5 %. Die spez. Aktivität der in der Kühlfalle zu verschiedenen Zeiten auskondensierten Wasserproben ist in Abb. 19 aufgetragen.

Dieser Versuch macht deutlich, daß die Anordnung dazu geeignet ist, Änderungen der spezifischen Aktivität (von im Käfig befindlichen "Wasserproben") schnell zu messen. Denn man erkennt aus Abb. 5 , daß beim Wechseln der Wasserproben, bereits die erste Messung (nach 15 min) nahezuden wahren Gehalt an Radioaktivität angibt. Ein "Verschmieren" des Aktivitätsprofils findet - in Sonderheit beim Aktivitätsanstieg - kaum statt.

Die Tatsache, daß die spezifische Aktivität des aufgefangenen Wassers auch nach 45 Minuten nur 97 % der eingesetzten Radioaktivität erreicht, liegt an einem Isotopieeffekt, der nach Moore bis zu 6 % betragen kann (37).

Daß die Werte in den ersten 15 Minuten nach Aktivitätsänderung erst bei 94,8 % bzw. noch bei 6,3 % liegen, ist wohl der Tatsache zuzuschreiben, daß in dieser Zeitspanne noch der Flüssigkeitsfilm an der Innenfläche des Käfigs die Werte leicht verfälscht.

Das Luftvolumen des Käfigs (500 ccm) dürfte hierbei keine Rolle spielen, da es im Verhältnis zur Durchströmungsluft (60 Liter pro Stunde) sicherlich vernachlässigt werden kann.

2.7.4. Mischeffekt des Tritium-markierten Atemwassers mit körperfremdem Wasser.

Zu Beginn der Versuche mit der von Wenzel-Kleucker entwickelten Apparatur wurden die Tiere regelmäßig nach zwei Stunden aus dem Käfig genommen, um sie vor Austrocknen zu schützen.

Beim Aufzeichnen des HTO-Gehaltes in der Atemluft (s. Abbildung 6) fielen stets zwei Dinge auf:

1. verzögerter Anstieg der Kurve in der ersten Stunde.
2. bei Fortsetzung der Messung nach vorübergehender Herausnahme der Tiere aus dem Käfig lagen die ersten Meßwerte erheblich zu tief. Danach stieg die HTO-Konzentration stark an und erreichte nach etwa zwei Stunden erst wieder die zu erwartenden Meßwerte (= gestrichelte Kurve in Abbildung 6).

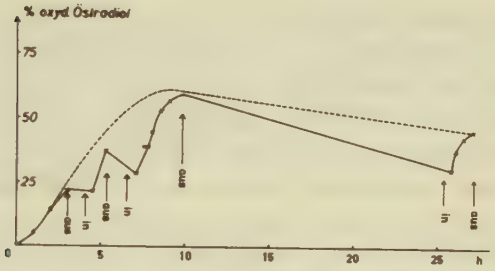


Abbildung 6

Verfälschung des Radioaktivitätsgehaltes im Atemwasser mit inaktivem Wasser.

Ordinate in % des eingesetzten Oestradiol-17α-T.

"in" = Ratte in den Käfig

"aus" = Ratte aus dem Käfig.

Diese Beobachtung ließ zunächst an eine Vermischung der HTO-gesättigten Ausatmungsluft mit einer in der Apparatur befindlichen Feuchtigkeit denken. Dies konnte ich jedoch durch die unter 2.7.3. beschriebenen Kontrollversuche mit HTO-Schälchen ausschließen.

Um zu sehen, ob die Tiere auch einen 8-Stunden-Aufenthalt im Käfig aushalten, ließ ich ein Tier über die gesamte Versuchsdauer im Käfig. Dabei lagen die so erhaltenen Meßwerte alle auf einer gleichmäßig ansteigenden Kurve. So bot sich an, als Erklärung für die Unregelmäßigkeiten der bisherigen Meßkurven anzunehmen, daß sich das dichte Rattenfell bei Herausnahme des Tieres mit H_2O aus der Luftfeuchtigkeit sättigt. Setzt man das Tier danach wieder

in den Käfig, so verdampft die Feuchtigkeit aus dem Fell in den Luftstrom und wird in der Kühlfalle als Kondensat aufgefangen. Sie verdünnt somit die spezifische Aktivität des Ausatmungswassers. Um dies zu prüfen, werden die Tiere 15 Minuten lang geföhnt, bevor sie in den Käfig gesetzt werden. Dies vermindert zwar den Effekt, beseitigt ihn jedoch nicht vollständig.

Als weiterer Faktor spielt sicherlich die Tatsache eine Rolle, daß die Ratte außerhalb des Käfigs normalfeuchte Luft einatmet. Diese Feuchtigkeit sorgt für den Flüssigkeitsfilm, der den gesamten Atemtrakt auskleidet. Atmet das Tier dann im Käfig wieder völlig trockne Luft ein, so sättigt sich seine Ausatmungsluft mit Wasser dieses Flüssigkeitsfilms, welcher zunächst keine Radioaktivität enthält und deshalb mit zur Verdünnung des HTO^1-Kondensats beiträgt.

Nach und nach wird so der HTO-freie Flüssigkeitsfilm abgebaut und durch einen HTO-haltigen Flüssigkeitsfilm ersetzt, welcher durch Sekretion der glandulae bronchiales und der Becherzellen in den bronchioli terminales entsteht. Erst wenn der gesamte Flüssigkeitsfilm des Atemtrakts vom Sekret dieser Drüsen gebildet wird, ist die Feuchtigkeit in der Atmungsluft ein getreuer Spiegel des Körperwassers und die Meßwerte entsprechen der tatsächlichen HTO-Konzentration im Körperwasser. Nach diesen Versuchen war klar, daß wir die Tiere immer während der ganzen Untersuchungszeit im Käfig belassen mußten. Ich tat dies immer 8 - 10 Stunden lang. Pitzel (39) bei späteren Untersuchungen sogar 3 Tage lang.

3. Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen der in vivo Oxydation von Oestradiol-17α-T zu Oestron und HTO.

Fishman et al. (30) injizierten gesunden Frauen 17 ß-Oestradiol 17α-T und isolierten aus dem Harn Oestradiol, Oestron, Oestriol und Pregnanolon. Der geringe Prozentsatz an wiedergefundener Aktivität an Steroiden zeigte, daß Oestradiol zum großen Teil zu Oestron oxydiert worden war, das dabei abgegebene Tritium konnten sie durch Bestimmung des HTO-Gehaltes im Blutplasma-Wasser nachweisen. Fishman et al. gaben bei ihren Untersuchungen jedoch keine Zeitabhängigkeit an und machten auch keine Aussagen über das Ausmaß der Oestradiol-Oxydation. Um sowohl über Zeitabhängigkeit wie Ausmaß der Oestradiol-oxydation etwas aussagen zu können, wurden folgende Versuche durchgeführt:

1. Oestradiol-17α-T wird gesunden männlichen Ratten i.m. injiziert und die Oxydationsrate durch Bestimmung des HTO-Gehaltes im Urindestillat ermittelt.

2. Oestradiol-17α-T wird gesunden männlichen Ratten i.m. injiziert. Es wird die oxydierte Menge durch Bestimmung des HTO-Gehaltes im Atemwasser in Abhängigkeit von der Zeit gemessen.

3. Es werden verschiedene Mengen Oestradiol injiziert, um zu untersuchen, ob die 17 ß-Steroid-Dehydrogenase den in vivo Umsatz von Oestradiol zu Oestron limitiert.

4. Oestradiol-17α-T wird männlichen Ratten injiziert, die mit CCl_4, Äthionin bzw. Thioacetamid (TAA) zur Leberschädigung vorbehandelt wurden. Es interessiert, ob und in welchem Maße die Oxydationsrate des Oestradiols zu Oestron verändert ist. Besonders wird der Unterschied zwischen akuter und chronischer Schädigung beachtet.

5. Zur morphologischen Kontrolle werden die Lebern der Tiere histologisch untersucht.

3.1. Bestimmung der Oxydation von Oestradiol-17α-T zu Oestron durch Messen der HTO-Konzentration im Urin.

Einer Gruppe von vier gesunden männlichen geschlechtsreifen Tieren wird Oestradiol-17α-T i.m. injiziert. Die Tiere werden in Stoffwechselkäfige gesetzt und ihr Urin in Auffanggefäßen gesammelt. Der so gewonnene Urin wird gefrier-destilliert, sein HTO-Gehalt pro ml Urinwasser gemessen und als Aliquot auf das Gesamtkörperwasser bezogen. Die errechneten Werte werden für den Zeitraum 0 - 16 h bzw. 41 - 48 h post inj. bestimmt. (Siehe Abb. 7)

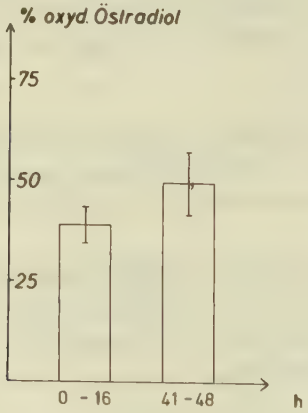


Abbildung 7

HTO-Konzentration im 0 - 16h-Urin und im 41 - 48 h-Urin geschlechtsreifer männlicher Ratten.
Injiziert wurden 40 µg Oestradiol-17α-T (25 µCi/Ratte). Ordinate in % des oxydierten Oestradiols. Mittelwerte von vier Tieren mit mittlerer Fehlergrenze.

Die Radioaktivitätsbestimmung durch Messung des Gehaltes an HTOim Urin-Destillat hat den Nachteil, daß sie ein Verfolgen des zeitlichen Ablaufs der Reaktion nur schlecht bzw. gar nicht erlaubt, da der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Messungen wegen der ge-

ringen Urinmenge der Tiere zu groß ist. Schon der erste Meßwert (für den Zeitraum 1 - 16 h post inj.) liegt bei 60 % ± 7,4 % des eingesetzten Oestradiols-17α-T. Die Methode ist also im Verhältnis zur Oxydationsgeschwindigkeit des Oestradiols zu langsam. Die hohe mittlere Fehlergrenze (2. Messung (für den Zeitraum 41 - 48 h post inj.) = 76 ± 12,7 %) erklärt sich durch mannigfache Verfälschungsmöglichkeiten (Futterkrümel, Kot, Trinkwasser und anderes im Urin-Auffangbehälter). Diese Art der Aktivitätsmessung erweist sich daher für die Bestimmung der Oxydationsgeschwindigkeit von Oestradiol bei Ratten als unzureichend. Eine wesentlich genauere Methode bietet sich bei der Verwendung der von Wenzel und Kleucker entwickelten Apparatur, welche für alle weiteren Untersuchungen benutzt wird.

3.2. Oxydation von Oestradiol-17α-T zu Oestron durch Bestimmung der HTO-Konzentration im Atemwasser.

Hierzu wird in der von Wenzel und Kleucker entwickelten Apparatur (siehe Abb. 3) eine Gruppe von 12 männlichen geschlechtsreifen Ratten untersucht. Die Tiere werden jeweils zu zweit neun Stunden lang in den Käfig gesetzt, nachdem ihnen vorher 0,25 mg Oestradiol-17α-T/kg Ratte i.m. injiziert wurden. Als Maß für die Oxydation des injizierten Oestradiols dient die spezifische Tritium-Aktivität des Atemwassers. Die gefundenen Werte werden in ein Koordinatensystem in Zeitabhängigkeit aufgetragen und ergeben so die Kurve in Abbildung 8. Nach 9 Stunden werden die Tiere über Nacht aus dem Käfig genommen und bekommen Futter und Trinkwasser. Am nächsten Tag werden die Tiere noch einmal für 3 Stunden in den Käfig gesetzt und die spezifische Aktivität des Atemwassers wird in der

dritten Stunde gemessen. Wir warten deshalb 3 Stunden, um Mischeffekte mit inaktivem Wasser im Tierfell oder dem Respirationstrakt (näheres siehe Methodik) auszuschließen.

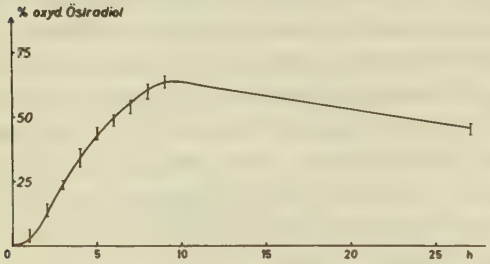


Abbildung 8

HTO-Konzentration im Atemwasser nach Injektion von Oestradiol-17α-T

Injiziert wurden 0,25 mg Oestradiol-17α-T/kg Ratte. Ordinate in % des oxydierten Oestradiols. Die senkrechten Striche zeigen jeweils die Extremwerte der Meßreihe von 12 gesunden Tieren an.

Wie die Kurve in Abbildung 8 zeigt, steigt die HTO-Konzentration in der 1. Stunde verzögert an. Danach nimmt ihre Steilheit kontinuierlich zu, durchläuft einen Wendepunkt, und nimmt danach wieder an Steilheit ab. Nach 9 Stunden erreicht die Kurve einen Maximalwert, welcher nur ganz allmählich abfällt.

Der Kurvenverlauf wird durch folgende Komponenten bestimmt:

1. Resorption des i.m. injizierten Oestradiols-17α-T.
2. Anstieg der Tritiumkonzentration im Atemwasser durch HTO-Bildung aus Oestradiol-17α-T.
3. Der Maximalwert durch Ausscheidung von Oestradiol-17α - T in Harn und Faeces.

4. Die in der Methodik diskutierten verfälschenden Mischeffekte des Ausatemwassers mit Feuchtigkeit aus Tierfell und Luft.
5. Den von Moore (37) beschriebenen Isotopieeffekt im Ausatemwasser, welcher vernachlässigbar ist, da er nur 5 ‰ beträgt.

Der verzögerte Anstieg der 1. Stunde erklärt sich aus den aufgeführten Punkten 1 und 4, da das injizierte Oestradiol etwa 20 Minuten braucht, bis es von der Injektionsstelle resorbiert ist und mit dem Blut zur Oxydation in die Leber transportiert ist. Außerdem wird zuerst nicht nur Atemwasser aufgefangen, sondern auch noch Wasser, welches sich im Fell der Tiere bzw. in der Apparatur befindet.

Die Streuung der Kurve ergibt sich aus dem unterschiedlichen Oestradiol-Oxydationsvermögen der 12 Tiere und Meßfehlern.

Die Steilheit des Kurvenanstiegs ist ein Maß für die Oxydationsgeschwindigkeit, der erreichte Maximalwert ein Maß für den Teil des injizierten Oestradiols, welcher im Organismus zu Oestron oxydiert wurde. Je mehr Oestradiol-17α-T im Harn direkt ausgeschieden wird, desto niedriger liegt das Plateau, weil dieses Oestradiol dann nicht mehr in der Leber oxydiert werden kann, also auch das Tritium am Steroidmolekül verbleibt.
Würde man die Tiere nach Oestradiol-17α-T-Injektion länger als 9 Stunden im Käfig belassen, so müßte die Kurve ein Plateau erreichen. Diese Annahme wurde durch spätere Untersuchungen, die Pitzel (39) an der gleichen Apparatur durchführte, bestätigt. Ein echtes Maximum könnte jedoch nie entstehen. Der allmähliche Abfall in meinen Kurven kommt dadurch zustande, daß die Tiere nach Herausnahme aus dem Käfig HTO-freies Wasser trinken und dadurch den HTO-Gehalt im Körperwasser verdünnen. Theoretisch läßt sich das Plateau der Kurve dadurch deuten, daß alles injizierte und

im Körper verbliebene Oestradiol oxydiert ist und die Tritium-Aktivität nur noch in Form von HTO vermischt im Gesamtkörperwasser vorliegt. Wenn dies der Fall ist, muß die Halbwertzeit der Tritium-Aktivität im Körperwasser nach 10 Stunden derjenigen Halbwertszeit gleichen, die man nach Injektion von HTO findet, falls man die Tiere normale Mengen Wasser trinken läßt.

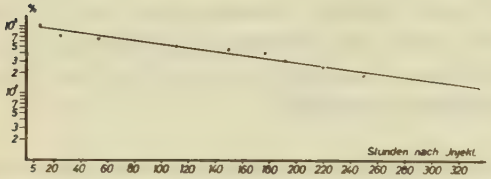


Abbildung 9

Zeitliche Abnahme des HTO-Spiegels im Körperwasser nach Injektion von Oestradiol-17α-T.

Verfolgen der spezifischen Tritium-Aktivität (HTO) über 320 Stunden nach Injektion von Oestradiol-17α-T (halblogarithmisch aufgetragen). Der 1. Meßpunkt 9 h post inj. = maximale Oestradioloxydation (vergl. Abb. 8) wurde gleich 100 % gesetzt.

Um dies zu prüfen, verfolgte ich die HTO-Konzentration im Körperwasser über 13 Tage. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt Abbildung 9. Die Halbwertszeit beträgt danach 4,3 Tage, was etwa mit den Ergebnissen von Thomson (52) und Christ (53), die Halbwertszeiten von 3,3 bzw. 4,1 Tagen angeben, übereinstimmt.

.3.2.1. Ist die 17ß-Steroid-Dehydrogenase der limitierende Faktor für den in vivo Umsatz von Oestradiol zu Oestron?

Es sollte eine evtl. Abhängigkeit der Oxydation am C-Atom 17 von der applizierten Oestradiolmenge untersucht werden.
Die Zeitabhängigkeit der Oxydation von Oestradiol-17α -T nach Injektion verschiedener Mengen von Oestradiol ist in Abbildung 10 dargestellt.

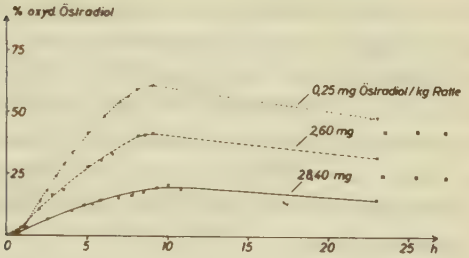


Abbildung 10
Oxydation von Oestradiol-17α -T bei unterschiedlicher Hormondosierung.
Ordinate in % des oxydierten eingesetzten Oestradiol-17α -T. Die Meßpunkte stellen Mittelwerte aus der Bestimmung bei 4 Tieren dar.

Wahrscheinlich wird mit steigender Oestradiol-Gabe eine steigende Menge von Oestradiol oder seinen - am C-Atom 17 nicht oxydierten - Derivaten verestert und im Urin ausgeschieden. Die Verlagerung der Maxima zu späteren Zeitpunkten bei den größeren Hormondosen könnte durch eine Depot-Bildung im Fettgewebe bedingt sein.

Berechnet man aus dem annähernd linearen Bereich der Kurven zwischen den Werten für die Zeitpunkte 0 und 5 Stunden post inj. die Oxydationsraten bei männlichen

Tieren (Abb.10, obere Kurve) und vergleicht sie mit Oxydationsraten von weiblichen Tieren (38) nach Gabe der gleichen Oestradiol-Dosis von 250 µg/kg Ratte, so ergibt sich eine Mindestoxydation von Oestradiol zu 17-Ketoverbindungen von 24 ± 1 µg/h pro kg Rattenweibchen und 19 ± 0,8 µg/h pro Rattenmännchen.
Mit anderen Worten: Rattenmännchen setzen pro Zeiteinheit etwas weniger Oestradiol als Rattenweibchen um. Damit werden die früher aus Harnanalysen gewonnenen Ergebnisse bestätigt (vergleiche Abschnitt 3.1. und (38)).
Man kann aus Abbildung 10 ferner erkennen, daß mit steigender Menge des applizierten Oestradiols ein relativ zur Applikationsdosis immer geringerer Prozentsatz in der Ratte oxydiert wird. Rechnet man die Relativwerte der 17-Hydroxysteroid-Oxydation jedoch auf Absolutwerte um, so steigt die jeweils von den Ratten in der Zeiteinheit oxydierte Steroidmenge bei steigender Steroidgabe erheblich an.

In Abbildung 11 wurde diese Abhängigkeit in ein beidseitig logarithmisch geteiltes Koordinatensystem eingetragen. Daraus ergibt sich eine direkte Abhängigkeit zwischen oxydierter und injizierter Steroid-Menge über mehrere Zehnerpotenzen.

Nach den in Abbildung 11 (siehe S. 26) dargestellten Ergebnissen kann der Organismus bei Oestradiol die 100- bis 1000-fache Menge der endogenen Hormonproduktion innerhalb weniger Stunden zu dem biologisch 10mal inaktiveren Oestron oxydieren.

Obwohl man bei sehr großen Dosen eine Sättigung der Steroid-Oxydation erwarten müßte, ist die Krümmung der Kurve in Abbildung 11 bei den höheren Dosierungen relativ gering.

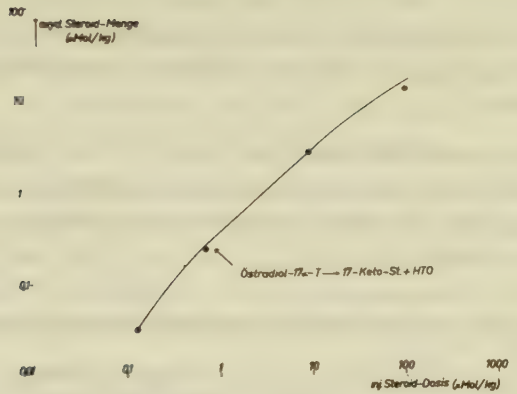


Abbildung 11

Abhängigkeit der Oestradiol-Oxydation am C-Atom 17 von der injizierten Dosis.

Auf der Ordinate ist in logarithmischer Einteilung diejenige Oestradiol-Menge (/uMol/kg Ratte) eingetragen, die innerhalb der ersten 5 Stunden post inj. oxydiert wurde. Auf der Abszisse ist ebenfalls in logarithmischer Einteilung die injizierte Oestradiol-Dosis eingetragen.

Daß die Steroid-Oxydation in vivo bei kleinem Steroidangebot nicht durch die Kapazität der entsprechenden Dehydrogenase limitiert sein kann, sei durch folgende Rechnung verdeutlicht: Vergleicht man z.B. die Oxydation nach Gabe von 0,25 Oestradiol/kg Ratte mit der nach Gabe von 28,4 mg Oestradiol/kg Ratte , so zeigen die in Abbildung 10 angeführten Werte, daß 5 Tiere mit einem Gesamtgewicht von 1 kg nach 5 Stunden nach Gabe von 28,4 mg bereits 3,65 mg (12,9 % der injizierten Dosis) in Position 17 oxydiert haben. Das heißt: Schon nach 5 Stunden ist in diesem Versuch etwa das Vierzehnfache (3,6 : 0,25) derjenigen Oestradiolmenge oxydiert, die in dem Versuch mit der niedrigen Oestradiol-Applikationsdosis (0,25 mg/kg Ratte) überhaupt insgesamt

appliziert wurde. Wenn also bei der niedrigen Oestradiolgabe von 0,25 mg/kg nach 5 Stunden nur 44,5 % (s. Abb.10) und nicht mehr der applizierten Menge oxydiert worden sind, kann die Ursache nicht in einer mangelnden Kapazität der Oestradiol-Dehydrogenase liegen.

Der begrenzende Faktor bei der in vivo Oxydation scheint eher die Verteilung des Oestradiols im Organismus und die damit erreichte Konzentration am Enzymort zu sein.

3.3. Oxydation des Oestradiol zu Oestron nach Leberschädigung. (25, 41, 42, 43)

Eine Leberschädigung ist mit verschiedenen Giftstoffen möglich. Eindrucksvoll wies Goslar et al. (40) eine Störung des Enzym-Musters nach CCl_4-Gabe enzymhistochemisch nach. Aus dem histologischen Bild wird deutlich, wie die Enzyme, die zunächst gleichmäßig über das Leberläppchen verteilt vorlagen, nach CCl_4-Gaben verklumpen und nur noch in der Läppchen-Peripherie vorkommen.

Es wurde immer wieder versucht, mit biologischen Methoden zu beweisen, daß die mit CCl_4 vorbehandelte Leber die Fähigkeit verliert Oestradiol zu inaktivieren. Talbot (41) gab 51 Rattenweibchen CCl_4, stellte die Gewichtszunahme des Uterus (bis zu 150 %) fest. Pincus et al.(42) fütterte CCl_4 an Rattenweibchen und stellte fest, daß danach der Ausfall des Vaginalabstrichs häufiger positiv war als bei unbehandelten Tieren.
Krichesky (43) versuchte schließlich mit CCl_4 bei Meerschweinchen eine Lebercirrhose zu erzeugen und stellte anschließend über 50 Tage eine erhöhte Ausscheidung der "Gesamt-Oestrogene" im Harn fest.

Differenzierte Aussagen darüber, ob bei dieser Schädigung die Aktivität der 17ß-Steroid-Dehydrogenase oder eines anderen inaktivierenden Enzymsystems wie die

Glucuronyltransferase (44, 55) vermindert ist, sind mit biologischen Untersuchungsmethoden nicht möglich.

In der hier beschriebenen Versuchsfolge sollte untersucht werden, ob verschiedene Giftstoffe eine Wirkung auf den vorwiegend in der Leber ablaufenden Oxydationsschritt Oestradiol → Oestron haben.

Es wurde versucht, mit CCl_4 (21,- 23, 41 - 47) und Äthionin (23, 24) eine akute Lebervergiftung zu erreichen, mit TAA (31, 34) eine chronische Leberschädigung nachzuahmen. Die histologischen Bilder so geschädigter Lebern werden unter Kapitel 3.4. besprochen.

3.3.1. Mit CCl_4 vorbehandelte Tiere (21, 22, 23, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47).
Untersucht wird eine Gruppe von 8 Ratten, von denen über vier Tage verteilt jeweils 2 Tiere bestimmte Mengen CCl_4 s.c. (unter die Rückenhaut) erhalten. Das erste Rattenpaar erhält insgesamt 3,6 ml/kg, das zweite insgesamt 4,3 ml/kg, das dritte und vierte insgesamt 19,2 bzw. 29,4 ml CCl_4/kg. Den so vorbehandelten Tieren wird am 5. Tag jeweils die gleiche Menge von 0,25 mg Oestradiol-17α-T/kg Ratte (etwa 25 /uCi) injiziert. Dann werden 2 Tiere gemeinsam in den Käfig der Apparatur gesetzt und über 9 Stunden lang wird alle 30 bis 60 Minuten die spezifische HTO-Aktivität im Atemwasser gemessen. Am 2. Tag werden die Tiere noch einmal für 3 Stunden in den Käfig gesetzt und einmal die Aktivität im Atemwasser gemessen.

Die gefundenen Meßwerte ergeben die Kurven in Abbildung 12. Sie zeigen:

a. Die mit 3,6 ml CCl_4/kg vorbehandelten Ratten haben in ihrer Oestradiol-Oxydationsfähigkeit noch keine Veränderung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren.
b. Bei den mit 4,3 ml CCl_4/kg vorbehandelten Ratten ist zwar die Oxydationsgeschwindigkeit deutlich ver-

mindert, es werden jedoch noch beinahe 62 % des eingesetzten Oestradiol-17α-T oxydiert. Dieser Maximalwert hat also etwa dieselbe Höhe wie der Maximalwert bei den unbehandelten Vergleichstieren. Er wird allerdings erst am 2. Tag post inj. erreicht (s. Abb. 13). Daraus ist zu schließen, daß die Konjugierung des Steroids im Vergleich zur Oxydation relativ langsam ablaufen muß, da sonst am 2. Tag nicht noch freies Oestradiol-17α-T zur Oxydation bereitstünde, sondern inzwischen mit dem Harn ausgeschieden wäre.

Um diese Beobachtung zu verdeutlichen trage ich die gefundenen Meßwerte für 29 h und 30 h post inj. in Abbildung 13 ein. Die zum Vergleich eingetragene Normalkurve zeigt ihren Maximalwert wesentlich früher.

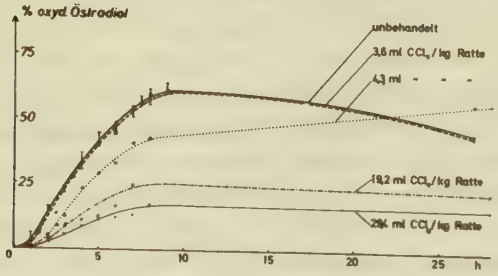


Abbildung 12

HTO-Konzentration im Atemwasser nach Injektion von Oestradiol-17α-T, an mit steigenden Mengen CCl_4 vorbehandelten Ratten.

Ordinate in % des oxydierten Oestradiols. Zum Vergleich wurde die Normalkurve aus Abbildung 9 mit Extremwerten eingetragen. Die Kurvenbilder zeigen die Meßergebnisse einer Versuchsserie, bei der zwei gleichermaßen vorbehandelte Tiere gleichzeitig im Käfig untersucht wurden.

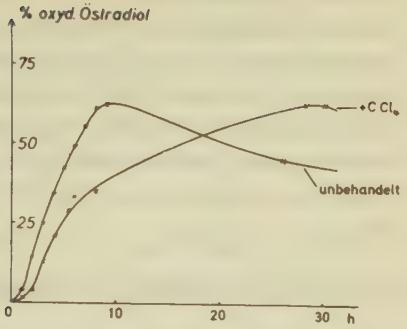


Abbildung 13

HTO-Konzentration im Atemwasser nach Injektion von Oestradiol-17α -T an 2 mit 4,3 ml CCl_4 /kg vorbehandelten Rattenl

Ordinate wie Abbildung 8. Abstand auf der Abszissenskala verändert.

c. Die Oxydationsgeschwindigkeit sinkt mit Zunahme der injizierten CCl_4-Menge weiter ab. Sie wird schließlich so langsam, daß der größte Teil der eingesetzten Oestradiol-17α -T - frei oder verestert - schon ausgeschieden wird, bevor er oxydiert werden konnte. Der maximale Oxydationswert liegt deshalb bei Gabe von 29,4 ml CCl_4/kg Ratte nur noch bei 17,3 % der injizierten Dosis. Das heißt: diese Tiere oxydieren nur noch 1/4 der Oestradiolmenge, die von gesunden Tieren in 9 Stunden oxydiert wird.

Die verminderte Oxydationsgeschwindigkeit bedeutet, daß das biologisch wirksame Hormon Oestradiol nur sehr viel langsamer in das 10mal weniger aktive Oestron umgewandelt wird. Das heißt: die "Inaktivierung" läuft nur langsamer ab. Dies wurde nach Untersuchung mit biologischen Methoden auch von Talbot (41), Pincus (42) und Krichesky (43) gefordert (vergleiche S. 27).

Die nur noch verminderte "Inaktivierungsfähigkeit" der CCl_4 geschädigten Leber ist wahrscheinlich auf eine Schädigung der 17ß-Steroid-Dehydrogenase zurückzuführen. Eine Forderung, die Ryan und Engel (25) schon 1953 aufstellten, nachdem sie nach Incubationsstudien mit Rattenlebergewebe fanden, daß das cirrhotische Lebergewebe Oestradiol in geringerem Ausmaß zu Oestron oxydiert als das normale Lebergewebe.

.3.3.2. Mit Äthionin vorbehandelte Tiere. (23, 24)

Die 2. Gruppe besteht aus 4 Tieren. Untersucht werden jeweils 2 Ratten, denen über 4 Tage verteilt, bestimmte Mengen Äthionin i.p. injiziert werden. Das. 1. Paar erhält 1500 mg Äthionin/kg Ratte, das 2. Paar 2100 mg Äthionin/kg.

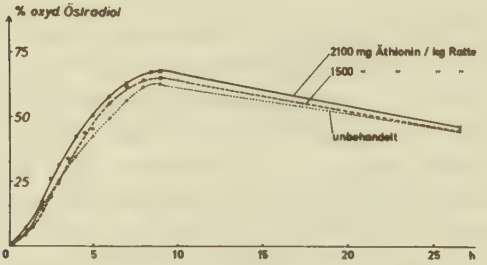


Abbildung 14

HTO-Konzentration im Atemwasser nach Injektion von Oestradiol-17α -T an mit Äthionin vorbehandelten Ratten.

Ordinate in % des oxydierten Oestradiols. Zum Vergleich wurde eine Normalkurve eingetragen.

Die Tiere wurden unter denselben Versuchsbedingungen wie die mit CCl_4 behandelten Tiere untersucht. Die erhaltenen Meßkurven sind zusammen mit einer Normalkurve in Abbildung 14 aufgetragen. Wie die Abbildung 14

zeigt, liegen beide Kurven der behandelten Tiere etwa im Streubereich der Norm, eher noch darüber, d.h. die Oxydationsfähigkeit ist bei den Tieren nicht beeinträchtigt. Ob Äthionin bei Gabe über längere Zeit (ich applizierte es nur über 4 Tage) doch noch eine mit unserer Versuchsanordnung nachweisbare Veränderung der Oestradiol-Oxydation bewirkt, wurde nicht untersucht.

3.3.3. Mit Thio-Acet-Amid (TAA) vorbehandelte Tiere.(31-34)

Untersucht werden 3 Tiere,* denen über 100 Tage lang jeweils pro Tag etwa 30 mg TAA/Ratte dem Futter beigemischt werden. Diese Tiere waren die letzten drei eines Kollektivs von 12 Tieren; die anderen 9 Tiere starben vor dem 100. Tag. Die Tiere wurden jeweils einzeln unter denselben Versuchsbedingungen wie die mit CCl_4 und Äthionin behandelten Tiere untersucht. Die Meßergebnisse werden wieder mit einer Normalkurve zusammen in Abbildung 15 dargestellt.

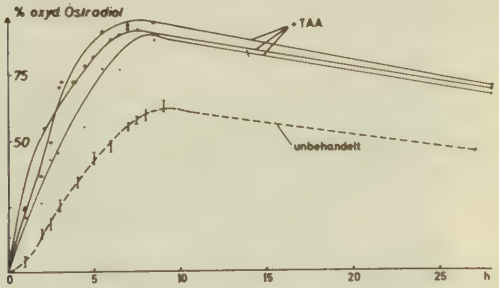


Abbildung 15

HTO-Konzentration im Atemwasser nach Injektion von Oestradiol-17α-T an mit TAA vorbehandelten Ratten. Ordinate in % des oxydierten Oestradiols. Zum Vergleich wurde eine Normalkurve eingetragen.

* Für die Überlassung dieser Tiere bin ich Herrn Professor Schwietzer (Pettenkofer-Institut, Berlin) sehr dankbar.

Aus den Kurven wird klar ersichtlich, daß die Oxydationsgeschwindigkeit bei den mit TAA vorbehandelten Tieren wesentlich beschleunigt und die oxydierte Oestrdiolmenge wesentlich höher als normal ist. Der Kurvenverlauf ähnelt dem bei Lebercirrhose-Patientinnen gefundenen Kurvenverlauf (28).

Nach den hier vorliegenden Ergebnissen aus Tierversuchen unterscheidet sich die akute Leberschädigung (CCl_4) im Hinblick auf die Veränderung der Oestradiol-Oxydationsfähigkeit der Leber grundlegend von der chronischen Schädigung (TAA). Bei der akuten Schädigung ist eine klare Verminderung der Oxydationsfähigkeit nachweisbar, bei der chronischen Leberschädigung ist die Oxydationsgeschwindigkeit deutlich erhöht und der prozentuale Umsatz des eingesetzten Oestradiol-17α -T signifikant vermehrt.

3.4. Histologie der untersuchten Rattenlebern (31 - 34, 46, 47)

Um eine morphologische Kontrolle für die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse zu haben, interessierte uns das histologische Bild der Tiere.

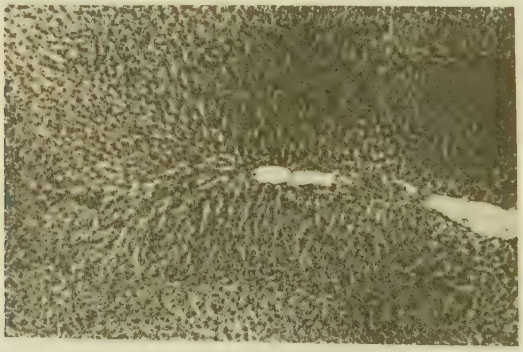


Abbildung 16
Rattenleber eines gesunden Kontrolltieres.
Färbung nach van Gieson, Vergrößerung etwa 20fach

Abbildung 16 zeigt das Bild einer gesunden Rattenleber. Bei der von uns gewählten van Gieson-Färbung stellt sich die normale Läppchenstruktur mit Zentralvene und radiär angeordneten Leberzellbalken dar. Das interlobuläre Bindegewebe konzentriert sich vorwiegend auf die Glissonschen periportalen Felder. Die Leberzellen sind groß, polygonal und besitzen meist nur einen Kern. Zellen und Kerne sind relativ konstant in ihrer Größe. Innerhalb des Endothelsyncytiums der Sinusoide findet man die von Kupfferschen Sternzellen.

Bei der Vorbehandlung der Tiere mit Äthionin zeigte das histologische Bild der Leber außer einer starken venösen Hyperämie und zellvermehrten Glissonschen Feldern keine auffälligen Veränderungen zur gesunden Leber. Deshalb wird hier auf eine Darstellung verzichtet.

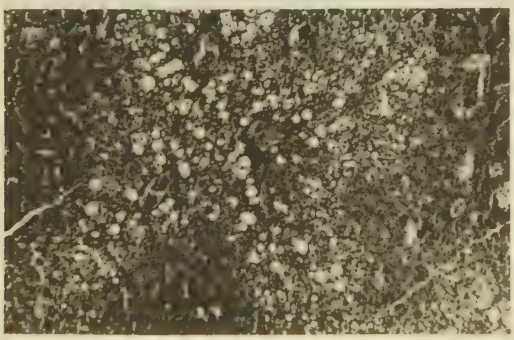


Abbildung 17

Rattenleber bei akuter Tetrachlorkohlenstoffvergiftung. Das Tier erhielt über 4 Tage verteilt insgesamt 19,2 ml CCl_4/kg Ratte. Färbung nach van Gieson. Vergrößerung etwa 20fach.

Abbildung 17 (46, 47) zeigt die Leber einer 4 Tage lang mit CCl_4 vorbehandelten Ratte. Hierbei ist besonders auffällig:

--die starke Verfettung überwiegend mittel bis großtropfig, besonders zentral und in der Intermediärzone. Das den Glissonschen Feldern anliegende Parenchym erscheint weit-

gehend normal.
--Die Kerngröße ist wenig schwankend, jedoch vielfach verdämmernde Kerne.
--Thrombogenisierung des Cytoplasmas.
--Geringe Proliferation der v. Kupfferschen Sternzellen, die in geringem Ausmaß doppeltbrechende Substanzen enthalten.

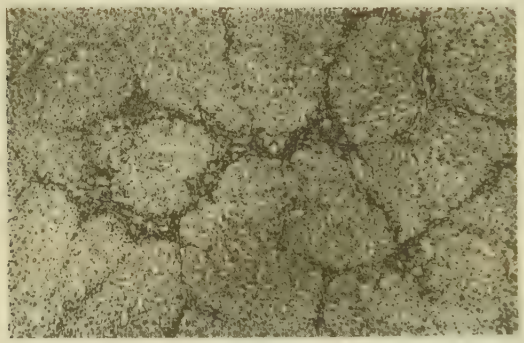


Abbildung 18

Rattenleber bei chronischer Thioacetamidvergiftung.
Das Tier erhielt 100 Tage lang täglich 30 mg TAA.
Färbung nach van Gieson, Vergrößerung etwa 20fach.

Abbildung 18 (31-34) zeigt dagegen das histologische Bild der Leber bei Ratten die über 100 Tage lang mit TAA vorbehandelt wurden.
Hierbei fällt auf:
--Feinnetzige, periportale Fibrose.(Der Fibroblastenreichtum und die rundzellige Infiltration lassen auf eine fortschreitende Fibrose schließen)
--Pseudolobulärer Umbau der Läppchen durch Abschnürung und Durchschnürung von Läppchenteilen.
--Auftreten von Regeneratknoten.
--Leberzellen und Kerne größenmäßig stark schwankend. Karyoplasma meist hell. Große Nukleolen, oft zwei und mehr. Karyorhexis und Karyolysis. Cytoplasma oft homogenisiert.

--Nekrobiotische Veränderungen im Sinne einer mäßig feinen Verfettung vorwiegend peripherer Zellen (sowohl praeexistenter Läppchen sowie im Rahmen der Lebercirrhose neugebildeter Läppchen) mit nur vereinzelt doppeltbrechenden Substanzen.

--Verfettung einzelner v.Kupfferscher Sternzellen.

--Tropfiges Fett vorwiegend in Zellen des neugebildeten Bindegewebes. Dieses Fett enthält kaum doppeltbrechende Substanzen.

*)

---

*) Für die großzügige Hilfe bei der Anfertigung und Beurteilung der histologischen Präparate bin ich Herrn Oberarzt Priv. Doz. Dr. Lindlar (Pathologisches Institut der Freien Universität Berlin im Städtischen Krankenhaus Westend) sehr dankbar.

Tabelle 2

Oestradiol-Oxydation bei geschlechtsreifen männlichen Ratten.

Tiere (Vorbehandlung)	Inj. Menge mg/kg	Maximale Oxydation in % Mittelwert	Stunden bis Maximalwert	Abbildung Nr.	Seite
Normaltiere	0,25	66,0 ± 3	8,5	8	22
Normaltiere	2,6	45,5 ± 2,4	9	10	24
Normaltiere	28,4	22,5 ± 1,8	10	10	24
Mit 3,6 ml/kg CCl_4	0,25	65,0 ± 2,8	9	12	29
Mit 4,3 ml CCl_4/kg	0,25	65,0 ± 4	29	13	30
Mit 19,2 ml CCl_4/kg	0,25	26,5 ± 1,8	8	12	29
Mit 29,4 ml CCl_4/kg	0,25	19,6 ± 1	8	12	29
Mit 1500 mg Äthionin/kg	0,25	67,0 ± 3	9	14	31
Mit 2100 mg Äthionin/kg	0,25	69,0 ± 2	9	14	31
Mit TAA (30 mg/Tag u. Ratte)	0,25	97,0 ± 5	8	15	32

4. Diskussion.

4.1. Methodische Kritik von Untersuchungen mit einer stoffwechsellabilen Tritiummarkierung. (3,27,28,36,45,49)

Wie die Untersuchungsergebnisse zeigen, läßt sich die radioaktive Markierung in 17α -Stellung gut dazu verwenden in vivo den Oxydationsschritt vom Oestradiol zu Oestron zu messen, da das bei der Oxydation abgespaltene Tritium als HTO im Körperwasser erscheint und dieses mit der Apparatur in kurzen zeitlichen Abständen im Atemwasser erfaßt werden kann. Dadurch erhält man beim Oestradiol einen Maßstab für die Oxydation dieses Steroidhormons zu dem biologisch um etwa eine Zehnerpotenz schwächer wirksamen 17-Ketosteroid Oestron, ohne auf die Isolierung einer Vielzahl von Derivaten des 17-Hydroxy- bzw. 17-Ketosteroids (z.B. Ester mit Schwefelsäure oder Glucuronsäure) angewiesen zu sein.

Allerdings erfaßt man bei der Aktivitätsmessung nur die primäre Oxydation des Hydroxysteroids und nicht eine eventuelle spätere Reduktion des Oestrons. Obwohl sich also das Gleichgewicht Hydroxy/Ketosteroid mit dieser Methode nicht messen läßt, ist die HTO-Bildung dennoch ein Maß für die Oxydation des Hydroxysteroids, weil nach den Untersuchungen von Fishman et al. (48) die Oxydation des Oestradiols weitaus schneller verläuft als die Reduktion von Oestron zu Oestradiol.

Bei einer quantitativen Aussage wird man jedoch folgende Faktoren berücksichtigen müssen:

1. Die Resorption des Steroids von der Injektionsstelle darf nicht der limitierende Faktor sein. Um dies zu prüfen, injizierte Pitzel (39) gleiche Steroidmengen einmal intravenös und einmal intramuskulär. Er fand, daß die Oxydationsraten beim Erreichen des Maximalwertes nach beiden Applikationsarten gleich hoch waren, die Oxydationsgeschwindigkeit jedoch bei i.v. Injektion schneller ist. Dies bedeutet: Für die Oxydationsmenge spielt die Applikationsart keine Rolle, jedoch

für die Oxydationsgeschwindigkeit, woraus zu schließen ist, daß bei i.m. Injektion der Transport des Oestradiol-17α-T von der Injektionsstelle zum Enzymort in der Leber langsamer geschieht als bei i.v. Injektion.

Ich injizierte bei allen Untersuchungen das Oestradiol einheitlich i.m. Außerdem verwendete ich als Lösungsmittel hydrophilen Propylenglykol, um einen Depoteffekt zu vermeiden.

2. Wie aus den Versuchen in Kapitel .3.2.3. deutlich wurde, liegt die 17ß-Steroid-Dehydrogenase im Organismus derart im Überschuß vor, daß sie normalerweise nicht der limitierende Faktor für die in vivo Oxydation des Oestradiols ist. Sicher spielt jedoch die Verteilung des Oestradiols im Organismus und die damit erreichte Konzentration am Enzymort in der Leber eine Rolle. Welche Rolle bei dieser Verteilung den Erythrozyten und welche den Trägerproteinen zukommt, ist bisher noch ebenso unsicher (s. dazu 4 S. 123) wie die Frage, welche anderen Transportsysteme noch für die Steroide existieren.

3. Nach Untersuchungen von Heusghem (54), Pearlman (61) u.a. verschwindet injiziertes Oestradiol bei i.v. Injektion sehr schnell aus dem Blut und diffundiert in die verschiedenen Gewebe, wobei die Verteilung vermutlich den Durchblutungs- und Permeabilitätsverhältnissen entspricht. Besonders dem Körperfett kommt dabei vermutlich die Funktion eines Depots für das lipophile Oestradiol zu. Dies kann dazu beitragen, daß wir maximal nur 70 % der applizierten Radioaktivität wiederfinden. (s. dazu Kapitel 4.2.)

4. Ein Teil des applizierten Oestradiol-17α-T wird entweder frei oder an Schwefelsäure bzw. Glucuronsäure verestert im Harn und mit der Galle ausgeschieden bevor es am C-Atom 17 oxydiert werden kann und dadurch sein Tritium im Körperwasser als HTO nachweisbar wird.

5. Für eine quantitative Aussage mit unserer Untersuchungsmethode ist eine weitere Voraussetzung, daß das aus dem Oestradiol-17α-T mit Hilfe der 17β-Steroid-Dehydrogenase entstandene DPNT bzw. TPNT schnell und möglichst quantitativ in die Atmungskette eingeschleust wird und zu Wasser verbrannt wird. Wenzel et al. (20, 35) konnten jedoch zeigen, daß ein geringer Teil der Tritium-Aktivität vom TPNT nicht zu HTO verbrannt wird, sondern auf andere Substanzen (Steroide, Lipoide ?) übertragen wird. So kann der Tritiumgehalt im Körperwasser bei unseren Untersuchungen immer nur ein Mindestmaß der Oxydation von Oestradiol-17α-T darstellen.

6. Betrachtet man die Kurven in den Abbildungen, die die spezifische Aktivität im Atemwasser angeben, so wird das Ansteigen der Kurvenäste durch die Resultanten zweier konkurrierender Prozesse bestimmt:
   a. Die Oxydation von Oestradiol-17α-T ⟶ DPNT ⟶ HTO führt zu einem Anstieg der HTO-Konzentration im Blut und damit im Atemwasser.
   b. Die Gleichgewichtseinstellung zwischen dem in der Leber gebildeten und ins Blut übertretende HTO und dem intrazellulären Körperwasser, bewirkt eine Verminderung der ursprünglichen HTO-Konzentration im Blut. Da nach Untersuchungen von Bloch et al. (50) schon nach etwa 20 min post inj. von HTO i.v. sich ein Gleichgewicht im Aktivitätsspiegel des Blutwassers und des Wassers in verschiedenen Geweben eingestellt hatte, nehmen wir auch bei unseren Versuchen an, daß das Erscheinen des Tritiums im Atemwasser nicht durch Austauschvorgänge zwischen Intra- und Extrazellulärraum limitiert ist.

Aus den Punkten 1 - 6 wird also deutlich, daß für die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Oxydation des injizierten Oestradiols eigentlich nur der Transport vom Ort der Applikation zum Enzymort in der Leber als limitierender Faktor auftreten kann. Dieser Transport wird wahrscheinlich vorwiegend durch die Bindung der Steroide an die

Albumine bestimmt, wie Arbeiten von Sandberg und Slaunwithe zeigten (56). Sie wiesen nach, daß verschiedene Steroide aus Harn oder wäßrigen Lösungen fast quantitativ an humane Serumalbumine adsorbiert werden.

4.2. Wie kann die veränderte Oestradioloxydation nach Leberschädigung erklärt werden?

Nach den Ergebnissen der Tierversuche, die noch einmal in Abb. 19 zusammengestellt sind, oxydieren gesunde und lebergeschädigte männliche Ratten Oestradiol mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zu Oestron.

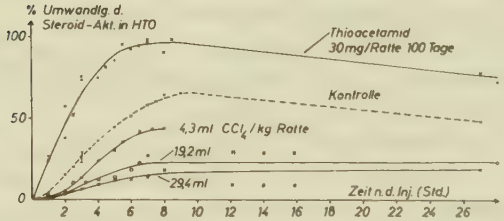


Abbildung 19

HTO-Konzentration im Atemwasser nach Injektion von Oestradiol-17α -T an verschieden vorbehandelten Ratten.
(Einzeldarstellungen s. Kap. 3.3.)
Ordinate in % der Oxydation des eingesetzten Oestradiols. Die Kurvenbilder der mit CCl_4 vorbehandelten Ratten zeigen die Meßergebnisse einer Versuchsserie, bei der zwei gleichermaßen vorbehandelte Tiere gleichzeitig im Käfig untersucht wurden.

Im einzelnen sind folgende Ergebnisse aus Abb. 19 zu diskutieren:

A. Bei gesunden Kontrolltieren finden wir nur maximal 70 % der eingesetzten Tritiumaktivität nach etwa 9 Stunden im Körperwasser wieder.

B. Chronische Leberschädigung durch langdauernde Behandlung (über 100 Tage) mit TAA mit dem histologischen Bild einer Lebercirrhose führt zu einer erheblich beschleunigten Oxydation von Oestradiol am C-17-Atom. Innerhalb von 7 Stunden werden etwa 96 % der injizierten Dosis oxydiert.

C. Akute Leberschädigung mit Ausbildung einer Fettleber durch CCl_4-Vergiftung führt zu einer verminderten Oestradiol-Oxydationsrate.

ad A. Wo verbleiben nun bei gesunden Tieren die restlichen 30 %? Folgende Verteilung erscheint mir wahrscheinlich:

1. Sicherlich diffundiert ein Teil des applizierten lipophilen Oestradiol-17α-T in das Körperfettgewebe, kleinere Mengen verteilen sich auf die Organe Niere, Lunge und Milz. Heusghem (54) fand nach i.v. Injektion von radioaktivem Oestran 16-C^{14} an Ratten schon nach 1 min 25 % der verabreichten Dosis in den Körperorganen wieder, wobei etwa 19 % in die Leber diffundiert waren, 2,4 % in die Nieren, 2 % in die Lunge und 1 % in die Milz.

2. Ein Teil des Oestradiol-17α-T wird im Serum an die Albumin Fraktion gebunden. (Slaunwithe (56))

3. Ein Teil des applizierten Oestradiol-17α-T wird entweder frei oder an Schwefelsäure bzw. Glucuronsäure verestert im Harn und mit der Galle ausgeschieden.

4. Ein Teil des vom Steroidmolekül abgespaltenen Tritiums wird nicht in die Atmungskette eingeschleust und zu HTO verbrannt, sondern über TPNT auf andere Substanzen wie Steroide (Lipoide?) (20) übertragen.

ad B. Wie kommt es nun zu den von uns gefundenen erhöhten Oxydationsraten bei chronisch lebergeschädigten Tieren?
Dabei werden folgende Punkte eine Rolle spielen:

1. Die Ausscheidung der Steroide über Galle und Urin geschieht entweder frei oder nach Veresterung mit Schwefel- bzw. Glucuronsäure. Das für die Veresterung notwendige Enzymsystem könnte bei chronischer Leberschädigung gestört sein, wie dies von manchen Untersuchern (44, 60) gefordert wird. Falls dies - was häufig bestritten wird - zutrifft, wird dadurch weniger Oestradiol im Harn ausgeschieden, und es kommt zu dem von vielen Untersuchern beobachteten höheren Steroid-Serumspiegel. Der erhöhte Serumspiegel bedeutet auch eine erhöhte Steroid-Konzentration am Enzymort, was wiederum eine erhöhte Oestradiol-Oxydationsrate zur Folge hat.

2. Weiter könnte die vermehrte Oestradioloxydation dadurch zustande kommen, daß die kranken Tiere weniger Körperfettgewebe besitzen. (Die gesunden Kontrolltiere wogen zwischen 180 - 210 g, die TAA-vorbehandelten Tiere zwischen 110 - 130 g.)

Oben wurde angeführt, daß dem Fett eine gewisse Depotfunktion zukommt. Es wäre also denkbar, daß die geschrumpften Fettdepots weniger Oestradiol speichern können. Dadurch bleibt mehr appliziertes Oestradiol-17α-T im Blut und kann dann auch vermehrt oxydiert werden, da die 17ß-Steroiddehydrogenase sehr stark im Überschuß vorliegt.

3. Die Steroide werden aber nicht nur in den Geweben im Organismus gespeichert, sondern sicherlich auch im Serum besonders an der Albumin Fraktion wie Sandberg und Slaunwithe s.o. zeigen konnten. Die Hauptfunktion dieser Proteinbindung ist der Steroidtransport. Solange das injizierte Oestradiol-17α-T an Albumine gebunden ist, kann es nicht oxydiert werden. Von Lebercirrhotikern wissen wir, daß die Albuminfraktion häufig stark vermindert ist. Wenn also bei chronisch Leberkranken weniger Albumine vorhanden sind, kann auch weniger Oestradiol daran gebunden werden, es bleibt also mehr freies Oestradiol im Blut und kann somit vermehrt oxydiert werden.

4. Schließlich kann der vermehrt gefundene HTO-Gehalt im Körperwasser nach Oestradiol-17α-T Applikation folgendermaßen zustande kommen: Wenzel und Pollow (20) konnten zeigen, daß ein geringer Teil der Tritiumaktivität nicht über DPNT in die Atmungskette geschleust wird, um dort zu HTO verbrannt zu werden, sondern über TPNT auf andere Substanzen (z. B. Steroide, Lipoide?) übertragen wird. Dieses Enzymsystem kann nach chronischer Leberschädigung derart gestört sein, daß alles Tritium über DPNT zu HTO verbrannt wird und somit vermehrt im Körperwasser auftritt. Ob diese

Umschaltung nach Leberschädigung wirklich eintritt, ist bisher nicht geprüft worden.

5. Inwieweit eine eventuelle Veränderung der Durchblutungsverhältnisse bei Leberschädigung (59) zu einer unterschiedlichen Oestradiol-Oxydation in vivo führt, muß dahingestellt bleiben.

Alle unter 1 - 5 aufgeführten Punkte können eine Rolle für die von uns gefundenen erhöhten Oxydationsraten bei chronisch lebergeschädigten Ratten spielen. Eine quantitativ entscheidende Rolle kommt wohl nur den Punkten 2 und 3 zu.

ad C. Eine akute Leberschädigung mit Ausbildung einer Fettleber durch CCl_4-Vergiftung führt zu einer Verminderung der Oestradioloxydation. Dies stimmt mit den Befunden älterer Arbeiten (Talbot 41, Pincus 42, Krischesky 43) überein, die mit biologischen Methoden nachzuweisen versuchten, daß nach CCl_4-Vergiftung die Leber vermindert Oestradiol zu oxydieren und damit zu inaktivieren vermag. Ryan und Engel (25) fanden bei der Inkubation von Oestradiol mit Leberschnitten von Ratten, die mit p-Dimethylamino-Azobenzol behandelt waren, ebenfalls eine verminderte Oestradioloxydation zu Oestron.

Worauf die verminderte Oestradioloxydation in vivo nach CCl_4-Schädigung zurückzuführen ist, läßt sich gegenwärtig nicht mit Sicherheit sagen. Daß die Kapazität zur Steroid-Oxydation bei Ratten durch die hier verwendete Steroidmenge von 0,25 mg Oestradiol/kg bei weitem nicht erschöpft ist, zeigten die Versuche in Kap. 3.2.1.

Oben wurde erwähnt, daß dem Fett eine gewisse Speicherfunktion für Steroide zukommt. Bei der akuten Leberschädigung bei Ratten durch CCl_4 schützt möglicherweise die Fetteinlagerung in das Lebergewebe (s. Abb. 17) das in die Leber transportierte Oestradiol vor dem Zugriff der 17ß-Steroid-Dehydrogenase.

5. Zusammenfassung.

Mit Hilfe von "Stoffwechsel-labil" mit Tritium markiertem Oestradiol-17α-T wird bei Ratten die in vivo Oxydation von Oestradiol zu Oestron gemessen. Von dem eingesetzten Oestradiol-17α-T wird durch die Oestradioldehydrogenase das Tritium auf Pyridinnucleotide übertragen und letztlich zu Tritiumwasser (HTO) verbrannt. Die Zunahme der Konzentration des Tritiumwassers im Gesamtkörperwasser gilt als Maßstab für die Mindestoxydation des Steroides.

1. Nach i.m. Injektion von Oestradiol-17α-T an gesunde männliche Ratten wird die HTO-Ausscheidung im Atemwasser (als Maß für die spezifische Aktivität im Körperwasser) in Zeitabständen von 30 Minuten gemessen. Dabei werden maximal 70 % der eingesetzten Tritiumaktivität zu HTO verstoffwechselt wiedergefunden. Nach Applikation von unphysiologisch hohen Oestradiolmengen (28 mg/kg Ratte) wird festgestellt, daß die 17β-Steroid-Dehydrogenase nicht der limitierende Faktor für die in vivo Oxydation von Oestradiol zu Oestron ist.

2. Gruppen von Ratten werden mit verschiedenen leberschädigenden Stoffen vorbehandelt. Dabei sinkt die maximale Oestradiol-Oxydation nach akuter Vergiftung mit Tetrachlorkohlenstoff von 65 % auf 20 % ab. Nach chronischer Leberschädigung mit Thioacetamid steigt die Oestradioloxydationsrate von 65 % auf 95 % des eingesetzten Oestradiols an.

Für die Versuchsergebnisse wird folgende Interpretation angeboten: Bei chronischer Leberschädigung kann es zu einer vermehrten Oestradiol-Oxydation kommen, weil das

applizierte Oestradiol - bedingt durch eine verminderte Einlagerung in die geschrumpften Fettdepots und eine geringere Bindung an die stark reduzierten Albumine - beschleunigt und vermehrt in die Leber transportiert wird, um dort oxydiert zu werden.

Bei der akuten Leberschädigung durch CCl_4 schützt möglicherweise die Fetteinlagerung in das Lebergewebe das in die Leber transportierte Oestradiol vor dem Zugriff der 17ß-Steroid-Dehydrogenase.

6. Literatur.

1. B. Zondek — Klin. Wschr. 9 I,393 (1934)
2. J. Fishman, H. L. Bradlow und T. F. Gallagher — J. Biol. Chem. 235,3104 (1960)
3. M. Wenzel und K. U. Blum — Z. Klin. Chem. 5/4 202 (1967)
4. E. Diczfalusy und Ch. Lauritzen — "Oestrogene beim Menschen" Berlin-Göttingen-Heidelberg Springer-Verlag (1961)
5. M. Levitz, G. P. Condon und J. Dancis — Endocrinology 58,376 (1956)
6. C. T. Beer und T. T. Gallagher — J. Biol. Chem. 214,335 (1955)
7. R. H. de Meio, A. E. Rakoff, A. Cantarow und K. E. Paschkis — Endocrinology 43,97 (1948)
8. P. Talalay und H. G. Williams-Ashman — Proc. nat. Acad. Sci. (Wash) 44,15 (1958)
9. K. J. Ryan und L. L. Engel — Endocrinology 52,287 (1953)
10. G. M. Tomkins — Rec. Progr. Horm. Res. 12,125 (1956)
11. W. H. Pearlman — Acta endocr. 17,321 (1954)
12. C. L. Gray und F. Bischoff — Amer. J. Physiol. 180,279 (1955)
13. P. Talalay und P. T. Marcus — J. Biol. Chem. 218,675 (1956)
14. S. L. Israel, D. R. Meranze und C. C. Johnston — Amer. J. med. Sci. 194,835 (1937)
15. J. Schiller — Endocrinology 36,7 (1945)
16. B. Zondek und J. Sklow — Proc. Soc. Exp. Biol. 46,276 (1941)
17. C. A. Villee und D. D. Hagerman — in C. W. Lloyd (Edit.) Endo. of Reproduction N. Y. Acad. Press. S. 317 (1959)
18. P. Talalay und H. G. Williams-Ashman — Rec. Progr. Hormon. Res. 16,1 (1960)
19. J. Jarabak, J. A. Adams, H. G. Williams-Ashman und P. Talalay — J. Biol. Chem. 237,345 (1962)
20. M. Wenzel und K. Pollow — Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. Band 349,1357 (1968)

21.	A. Brunschwig, C. Johnson und S. Nichols	Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 60,388 (1945)
22.	V. A. Drill	Ann. N. Y. Acad. Sci. 57,654 (1954)
23.	H. Popper und C. Bruce	J. nat. Cancer Inst. 15,1597 (1955)
24.	H. Popper, F. Steigmann, A. Dubin, H. A. Dymewicz und F. P. Hesser	Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 68,676 (1948)
25.	K. J. Ryan und L. L. Engel	Endocrinology 52,277 (1953)
26.	S. P. Liebermann und S. Teich	Pharmacol. Rev. 5,285 (1953)
27.	M. Wenzel und E. Kraas	Acta endocr. K'hvn. 56,385 (1967)
28.	M. Wenzel, K. U. Blum und E. Kraas	Z. Klin. Chem. 6/4,265 (1968)
29.	T. Günther	Dissertation Med. Fak. F. U. Berlin (1956)
30.	J. Fishman, H. L. Bradlow, L. Hellmann und T. F. Gallagher	Acta endocr. 37,57 (1961)
31.	C. H. Schwietzer und G. Schaetz	4. Freiburger Symposion (1956)
32.	A. M. Ambrose, F. De Eds und L. J. Rather	J. Ind. Hyg. Tox. 31,158
33.	O. G. Fritz Hugh und A. A. Nelson	Science (Lancaster, Pa.) 108,626 (1948)
34.	L. I. Rather	Bull. Johns Hopkins Hosp. 88,38 (1951)
35.	M. Wenzel, K. Pollow, T. Ziebarth	Z. Naturforschg. 22 b,894 (1967)
36.	M. Wenzel, H. Kleucker und P. E. Schulze	Z. Naturforschg. 21 b,1178 (1966)
37.	R. Moore	Health Physics 7,161 (1962)
38.	H. Kleucker	Dissertation F. U. Berlin (1966)
39.	L. Pitzel	Diplomarbeit F. U. Berlin (1967)
40.	K. Goslar	Arzneim. Forsch. 16,359 (1966)

41. N. B. Talbot — Endocrinology 25/601 (1939)

42. G. Pincus und D. W. Martin — Endocrinology 27/838 (1940)

43. B. Krichesky — Endocrinology 40/437 (1947)

44. C. H. Hammar und W. Prellwitz — Klin. Wschr. 44/17/1010 (1966)

45. M. Wenzel, P. E. Schulze — Tritium-Markierung Walter de Gruyter & Co. Berlin 1962

46. H. Popper und F. Schaffner — Die Leber. Struktur und Funktion Georg Thieme Stuttgart (1961)

47. M. Griffiths und N. Pace — Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 83,771 (1953)

48. J. Fishman, H. L. Bradlow, B. Zumoff und L. Hellmann — J. Biol. Chem. 235/3104 (1960)

49. K. U. Blum und M. Wenzel — J. F. Bergmann Kongreß-Band 73/IV 326 (1967)

50. J. H. Bloch, F. K. Millar, A. R. Harris, N. J. Berlin, J. White — J. Appl. Physiol. 16,181 (1961)

51. J. Fishman, H. L. Bradlow und T. F. Gallagher — J. Amer. chem. Soc. 81,2273 (1959)

52. R. C. Thompson — J. Biol-Chem. 200,731 (1953)

53. W. Christ — Diplomarbeit F. U. Berlin (1966)

54. C. Heusghem — Liège Thone 1956

55. I. L. Riegel und R. K. Meyer — Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 80,617 (1952)

56. A. A. Sandberg und W. R. Slaunwithe jr. — J. clin. Invest. 36,1266 (1957)

57. H. Diringer — Diplomarbeit F. U. Berlin 1964

58. W. Bolt, F. Ritzl und H. M. Bolt — Münch. Med. Wschr. 27,1356 (1965)

59. Preedy, J. und E. Aitken — J. Clin. Invest. 35,430 (1956)

60. H. A. Kühn — Glucuronsäurestoffwechsel bei Lebergesunden und Leberkranken. (3. Lebertagung der Sozialmediziner) Thieme, Stuttgart 1964

61. K. Junkmann — In: B. Flaschenträger und E. Lehnartz: Physiolog. Chem., Bd. 2/2 b, S. 425, Springer Berlin-Göttingen-Heidelberg 1957

Die Arbeit wurde unter der Leitung von
Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. M. W e n z e l
im Physiologisch-Chemischen Institut der
Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. E. S c h ü t t e
möchte ich meinen herzlichen Dank aus-
sprechen für die Bereitstellung des Ar-
beitsplatzes.

Herrn Priv. Doz. Dr. M. W e n z e l
bin ich sehr dankbar, daß er mir das
Thema überließ und immer für wertvolle
Anregungen im Verlauf der Arbeit Zeit
fand.

Lebenslauf

Am 30. September 1941 wurde ich in Halle/S. geboren. Meine Mutter ist Frau Johanna Rothe, gesch. Kraas, geb. Schmieden. Mein Vater Professor Dr. med. Ernst Kraas war damals a.o. Professor für Chirurgie an der Universität Halle.

Ausbildung:

1948 - 1952 Volksschule in Lichtenberg/Odenwald.
1952 - 1954 Internat Neubeuern/Inn Oberbayern.
1954 - 1961 Humanistisches Lessing-Gymnasium in Frankfurt/M.
1961 Abitur
1962 - 1963 Universität Freiburg
1963 Physikum mit Note "gut"
1963 - 1964 Universität Hamburg
1964 - 1965 Université de Paris als Stipendiat des Gouvernement francais.
1965 - 1967 Freie Universität Berlin
Arbeiten an der Doktorarbeit
Seit 1.4.1966 bezahlte Hilfsassistentenstelle am Physiolog. Chem. Institut der F.U. Berlin
1967 Staatsexamen mit Note "gut"

Am 1.12.1967 beabsichtige ich meine erste Medizinal-Assistentenstelle in Abeokuta/Nigeria/West-Afrika als Stipendiat des Deutschen Akademischen Austauschdienstes anzutreten.

Druck: Dissertationsdruckstelle, 1 Berlin 33